

# Asiat对脑梗死大鼠氧化应激、Fos蛋白及Ki67蛋白水平的影响

齐凡星<sup>1</sup> 胡莹<sup>2</sup> 李静<sup>1</sup> 张静<sup>1</sup> 张欣<sup>1</sup> 高娟<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>保定市第一中心医院神经内科, 保定 071000; <sup>2</sup>保定市第一中心医院心血管内科, 保定 071000)

**摘要** 探讨Asiat对脑梗死大鼠氧化应激、Fos蛋白及Ki67蛋白水平的影响。将60只大鼠平均分为假手术组(sham组)、脑梗死大鼠模型组(CI组)和脑梗死大鼠模型加Asiat治疗组(Asiat组)。对三组大鼠的神经行为学、脑积水量、脑梗死体积进行评定; ELISA检测细胞因子浓度; 用HE染色观察脑组织形态的改变; TUNEL染色检测神经元细胞凋亡情况; 用Western blot检测Fos蛋白和Ki67蛋白的表达情况。结果发现, CI组的NO和MDA浓度比sham组大鼠显著增加( $P<0.05$ ), CI组大鼠SOD的活性显著降低( $P<0.05$ ); 和CI组大鼠相比, Asiat组大鼠的NO和MDA浓度明显下降, SOD的活性显著升高( $P<0.05$ )。CI组大鼠的脑组织积水明显增多, 脑梗死体积也显著增加, 并且脑组织神经元细胞也出现了大量的凋亡; CI组大鼠细胞质的染色不均匀, 细胞核的染色较深, 神经元的数量显著降低; Asiat组大鼠的脑组织积水量明显减少, 脑梗死的体积显著降低, 细胞凋亡数量减少, 脑组织形态明显改善。与sham组相比较, CI组大鼠Fos蛋白含量明显增多, Ki67蛋白含量显著减少( $P<0.05$ ); Asiat组大鼠Fos蛋白含量比CI组大鼠显著减少, Ki67蛋白含量比CI组大鼠明显增多( $P<0.05$ )。该研究结果表明, Asiat可抑制脑梗死大鼠氧化应激反应, 抑制Fos蛋白表达, 促进Ki67蛋白表达, 进而对脑组织起到保护作用。

**关键词** Asiat; 脑梗死; 氧化应激; Fos蛋白; Ki67蛋白

## Effects of Asiat on Oxidative Stress, Fos Protein and Ki67 Protein in Rats with Cerebral Infarction

QI Fanxing<sup>1</sup>, HU Ying<sup>2</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup>, ZHANG Xin<sup>1</sup>, GAO Juan<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Neurology, Baoding No.1 Central Hospital, Baoding 071000, China;

<sup>2</sup>Department of Cardiovascular Medicine, Baoding No.1 Central Hospital, Baoding 071000, China)

**Abstract** To explore the effects of Asiat on oxidative stress and the protein expression of Fos and Ki67 in rats with CI (cerebral infarction), sixty rats were randomly assigned into sham group (sham operation group), CI group (CI model group) and CI operation plus Asiat group (Asiat treatment group). Then, the neurobehavioral, hydrocephalus, and CI volume of rats in each group were evaluated. Cytokine concentration was detected by ELISA. Morphology of brain tissues was observed by HE staining. Additionally, neuronal cell apoptosis was detected by TUNEL staining. Fos protein and Ki67 protein expression were detected by Western blot. Results showed that the concentrations of NO and MDA were significantly higher, but the activity of SOD was reduced in the CI group

收稿日期: 2020-07-22 接受日期: 2020-09-15

保定市科技计划(批准号: 1951ZF053)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18617789819, E-mail: gaojuanzhulia@163.com

Received: July 22, 2020 Accepted: September 15, 2020

This work was supported by Baoding Science and Technology Planning Project (Grant No.1951ZF053)

\*Corresponding author. Tel: +86-18617789819, E-mail: gaojuanzhulia@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5379>

compared with those in the sham group ( $P<0.05$ ). Compared with rats in the CI group, the concentrations of NO and MDA decreased significantly, and the activity of SOD increased significantly in the Asiat group ( $P<0.05$ ). In CI group, the amount of hydrocephalus in brain tissues, the volume of CI and the apoptosis of neuronal cells increased significantly compared with sham group. In addition, the cytoplasm was stained unevenly; the nucleus was stained deeper; and the number of neurons was lower in CI group than those in sham group. On the contrary, the hydrocephalus, CI and neuronal cells apoptosis were obviously attenuated, and the morphology of brain tissues was significantly improved in the Asiat group. Compared with the sham group, the expression of Fos protein increased, while the expression of Ki67 protein decreased in the CI group ( $P<0.05$ ). However, Asiat treatment recovered Fos and Ki67 expressions ( $P<0.05$ ). In conclusion, this study showed that Asiat could inhibit the oxidative stress response of rats with CI, and the expression of Fos protein, and promote the expression of Ki67 protein, thereby exhibiting its protective effect on brain tissues.

**Keywords** Asiat; cerebral infarction; oxidative stress; Fos protein; Ki67 protein

脑梗死(cerebral ischemic stroke, CI)又称缺血性脑卒中,在临床上可导致残疾和死亡的发生。近些年,脑梗死的发病率随着我国经济的快速发展而不断上升,老年人患脑梗死疾病的人数也越来越多,并且该病的发病年龄越来越趋于年轻化<sup>[1]</sup>。脑梗死主要是由于血脑屏障被破坏,改变了血管原来的形状,同时减少了大脑血流的供应,从而导致脑中风等疾病的发生<sup>[2]</sup>。研究表明,发生脑梗死的基本病因是动脉粥样硬化,而氧化应激和脂质过氧化等都参与其中,并在脑梗死的一些病理过程中起着重要的作用<sup>[3]</sup>。在脑梗死的发生发展中,氧化应激反应贯穿其中,当局部的脑血管受到了堵塞,周围的神经细胞出现缺血和缺氧的情况时,会发生缺氧性的损伤,产生大量氧自由基的同时直接损伤受损的细胞膜,最后导致细胞的异常,甚至会导致细胞的凋亡<sup>[4-5]</sup>。脑缺血过程中氧化产物的大量产生和抗氧化系统失活都可诱导神经细胞膜发生脂质过氧化,诱导神经细胞凋亡,导致脑损伤的进一步加重<sup>[6]</sup>。即刻早期基因 *c-fos* 及其表达产物 Fos 蛋白在神经元活动时表达活跃,被广泛用作神经元兴奋的标志物,通常通过观测 *c-fos* 基因在脑梗死后海马中的表达情况来了解海马神经元的凋亡情况。正常情况下神经元内 Fos 蛋白表达水平很低,而脑缺血时 Fos 蛋白表达显著升高。近年来也有研究证实,在脑梗死患者的大脑皮层和海马中均有 Fos 蛋白的表达,并且 Fos 对细胞的生长和分裂等都有着一定的调控作用<sup>[7]</sup>。Ki67 蛋白是一种增殖细胞相关的核蛋白,可反应细胞的增殖情况,并且是重要的细胞增殖标记物,参与着脑细胞的增殖情况<sup>[8]</sup>。所以,有效的改善氧化应激反应、调控 Fos 蛋白和

Ki67 蛋白的正常表达对脑梗死患者的预后具有重要的意义,但到目前为止还没有研究明确有药物能对其进行调控和改善。积雪草是一种伞形科植物,作为传统药用植物,其药理作用得到了诸多药理文献的证实。现代天然药物化学的研究表明,积雪草全草中含有积雪草苷(Asiat)、积雪草酸等多种三萜类化合物,他们是积雪草中主要生物活性成分,其中又以积雪草苷最为主要。早有研究报道积雪草苷可以提高机体对各种非特异性刺激的抵抗力,从而发挥抗抑郁作用,积雪草苷在精神障碍领域的研究由此展开<sup>[9]</sup>。此后国内的研究证明,积雪草苷具有增强记忆,保护神经细胞的作用<sup>[10]</sup>。在上述研究的基础上,本文制备脑梗死大鼠模型并用 Asiat 进行干预,以探究 Asiat 对脑梗死大鼠氧化应激和 Fos、Ki67 蛋白水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

本实验选用由河南省实验动物中心[合格证号:SCXK(豫)2010-0002]提供的60只雄性SD大鼠。全部大鼠均属于清洁级,所有大鼠健康且没有任何疾病,大鼠体质量在280~300 g,常温下饲养大鼠,大鼠自由饮水摄食5天,待所有大鼠适应新的环境后,再进行相关实验,实验在河北医科大学动物实验中心进行,经本单位动物伦理审查委员会批准通过。

### 1.2 试剂和仪器

本实验所用的所有试剂和仪器包括:北京索莱宝生物科技公司生产的Asiat;北京西浓科技有限公司生产的线栓;武汉博士德生物工程有限公司生产的

Fos抗体; 英国Abcam公司生产的Ki67抗体; 碧云天生物科技公司生产的RIPA裂解液、HE染色试剂、BCA试剂盒; 瑞士罗氏生物科技公司生产的TUNEL染色试剂盒; 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产的BS380型生化分析仪; 北京六一仪器厂生产的石蜡切片机、电泳仪、电泳槽等。

## 2 实验方法

### 2.1 动物分组与模型建立

将60只大鼠平均分为三组: 假手术组(sham组)、脑梗死大鼠模型组(CI组)和脑梗死大鼠模型加Asiat治疗组(Asiat组), 每组20只。本文采用线栓法制备脑梗死大鼠模型, 术前三组大鼠均禁食1天, 饮水正常。将所有大鼠麻醉后进行固定, 颈部消毒, 沿颈部的中位线切开, 充分暴露视野, 分离大鼠左侧颈总、颈内和颈外动脉, 结扎颈外动脉主干和颈总动脉近心端, 并在颈总动脉远心端备线, 分离颈内动脉至翼腭动脉, 动脉夹夹闭颈内动脉近心端, 在颈总动脉主干分叉处剪一约0.2 mm的V形切口, 将尼龙线栓从颈总动脉切口处缓慢插入, 经颈总动脉分叉后沿颈内动脉入颅, 至大脑前动脉, 稍感阻力时停止, 插入深度从分叉处计17~19 mm, 然后用手术线结扎颈内动脉以扎紧线栓, 剪去多余的尼龙线, 缝合皮肤, 在术中和术后用小型负反馈电热板对动物进行保温, 使其肛温保持在37 °C, 待大鼠苏醒后放入笼中正常喂养。CI组和Asiat组大鼠均按照上述的方法制备脑梗死大鼠模型, sham组大鼠仅用线栓插入到大脑中动脉的起始端后立即拔除, 其他手术步骤均和其他两组相同。

造模成功后2 h, Asiat组大鼠腹腔注射2.5 mg Asiat(溶于5 mL生理盐水), sham组大鼠和CI组大鼠

均腹腔注射生理盐水5 mL, 三组大鼠每天注射一次, 共干预7天。

### 2.2 收集标本

在最后一次给药后4 h, 将所有大鼠麻醉, 打开大鼠胸腔取心脏处的血液, 将其在室温的环境中放置1 h, 离心后取上清液, 放到-20 °C冰箱中保存。取10只大鼠的新鲜脑组织放置在-20 °C的环境中保存备用。每组剩下的10只大鼠进行断头处理, 取出新鲜脑组织, 用液氮快速冷冻后, 置于-80 °C冰箱中保存。

### 2.3 神经行为学评分

对大鼠的神经行为学进行评分, 测定时间点为手术后的3 h, 给药后的1天、3天和7天。筛选测定评分为1~3分的大鼠进行后续实验, 把没有损伤和损伤太严重的大鼠全部剔除, 并予以补充(表1)。

### 2.4 ELISA检测细胞因子浓度

把取出的血清置于4 °C中进行溶解, 室温的环境中让血清静置0.5 h后, 测定血清中MDA、NO的含量和SOD的活性。

### 2.5 各组大鼠脑组织含水量测定

麻醉每组部分大鼠, PBS溶液从左心室开始灌注, 直至留出的液体呈透明时停止灌注。把所有大鼠的脑组织取出, 将脑组织中的嗅球、小脑和地位脑干全部去除, 去除后称取脑组织的湿质量(W); 把湿质量的脑组织放置在恒温干燥箱中, 温度为110 °C, 烘烤2天后称取脑组织干质量(D)。脑组织含水量=(湿质量-干质量)/湿质量×100%。

### 2.6 脑梗死体积测定

取出冷藏在-20 °C环境中的脑组织, 把脑组织沿冠状做5个切片, 用TTC溶液进行染色, 溶液浓度为2%; 染色后室温环境下孵育0.5 h, 显色后观察脑

表1 大鼠神经行为学评分标准

Table 1 Neurobehavioral scoring criteria of rats

等级 Grade	内容 Content
Level 0	There was no neurological deficit
Level 1	Failure to fully extend the forelimb on the opposite side of the ischemic lesion was defined as a mild disturbance
Level 2	Turning to the opposite side of the ischemic lesion was delineated as moderate focal neurological dysfunction
Level 3	Dumping to the opposite side of the ischemic lesion was defined as severe focal neurological dysfunction
Level 4	Can't walk, appear consciousness obstacle

组织颜色, 红色为正常的脑组织, 灰白色为梗死的脑组织。用软件分析大鼠的脑组织图像, 分别测定正常区域的体积和梗死区域的体积。

## 2.7 大鼠脑组织HE染色

分别取出三组大鼠的脑组织, 甲醛固定后, 用石蜡包埋并将其切成厚度为5  $\mu\text{m}$ 的薄片, 脱蜡后进行HE染色, 最后用显微镜对染色的脑组织进行观察, 观察组织形态的变化。

## 2.8 TUNEL染色检测大鼠脑组织神经元细胞凋亡

取三组大鼠的脑组织, 固定后石蜡包埋、把组织进行切片, 用TUNEL法染色, 所有的步骤按照试剂盒上的说明书严格进行。并观察三组黄褐色凋亡的细胞数量。计算细胞凋亡的指数(apoptosis index, AI): 每张进行TUNEL染色的切片选取6个清晰的视野, 观察后取每组的平均值。AI=凋亡的细胞数量/细胞的总数量 $\times 100\%$ 。

## 2.9 Western blot检测大鼠Fos蛋白和Ki67蛋白的表达

三组大鼠分别取脑组织50 mg, 剪碎组织后将裂解液加入其中, 裂解30 min, 4  $^{\circ}\text{C}$ 环境下3 000 r/min离心5 min后取上清液, 用BCA法对蛋白的浓度进行检测, 分装后, 保存在-20  $^{\circ}\text{C}$ 的环境中。将提取出的蛋白溶液和缓冲溶液按照4:1进行混合, 加热变性后灌胶上样。每孔上样量为20  $\mu\text{L}$ , 进行SDS-PAGE电泳, 分离蛋白。用半干法转移蛋白至PVDF膜上, 用5%脱脂牛奶, 在37  $^{\circ}\text{C}$ 环境下封闭蛋白质2 h, 随后加入一抗, 4  $^{\circ}\text{C}$ 环境中孵育过夜。TBST洗涤3次后孵育二抗。漂洗后进行增强型化学发光试剂显色, 胶片扫描, 以 $\beta$ -actin为内参, 用Image J软件对蛋白质条带灰度值进行定量分析。

## 2.10 统计学分析

采用SPSS 19.0统计学软件进行分析, sham

组、CI组和Asiat组的计算结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用 $t$ 检验, 每组之间的数据分析用单组间的因素进行分析, 每组以 $P<0.05$ 表示具有显著差异。

## 3 结果

### 3.1 三组大鼠神经行为学评分比较

sham组神经行为学评分为0。手术后3 h, CI组和Asiat组大鼠的神经行为学评分无显著变化( $P>0.05$ )。与CI组大鼠相比, Asiat组大鼠给药后的1天、3天和7天的神经学评分明显变好( $P<0.05$ )(表2)。

### 3.2 Asiat对氧化应激的作用

与sham组相比较, CI组大鼠外周血清中NO和MDA含量显著升高( $P<0.05$ ), 而SOD的浓度却明显比sham组大鼠低( $P<0.05$ ); 与CI组相比较, Asiat组大鼠NO和MDA水平明显降低, 而SOD浓度却显著升高( $P<0.05$ ), 由此可见, Asiat可明显抑制脑梗死大鼠的氧化应激反应(图1)。

### 3.3 三组大鼠脑组织含水量比较

和sham组大鼠相比较, CI组大鼠脑组织含水量明显增多( $P<0.05$ ); 和CI组大鼠相比, Asiat组大鼠的脑积水量显著降低( $P<0.05$ )(图2、表3和图3)。

### 3.4 三组大鼠脑梗死体积比较

和sham组大鼠比较, CI组脑梗死的体积明显增多( $P<0.05$ ); 而Asiat组大鼠相比于CI组大鼠梗死组织的体积显著减少( $P<0.05$ )(表4和图4)。

### 3.5 HE染色比较三组大鼠脑组织形态

和sham组大鼠相比, CI组大鼠神经细胞有大量的水肿出现, 空泡现象严重, 胞质的染色情况也不均匀, 细胞核的染色相对较深, 神经元数量显著减少; 和CI组脑组织形态相比, Asiat组大鼠脑组织形态得到明显的改善(图5)。

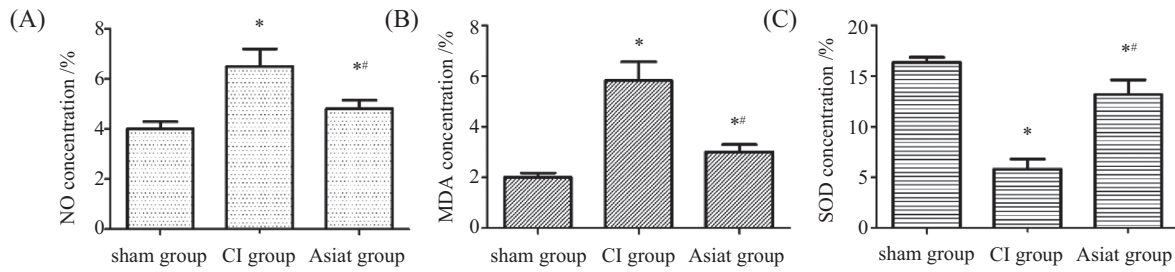
表2 三组大鼠神经行为学评分比较

Table 2 Comparison of neurobehavioral scores among the three groups

组别 Group	<i>n</i>	术后3 h There hours after operation	给药后1天 One day after administration	给药后3天 There days after administration	给药后7天 Seven days after administration
CI group	20	1.51 $\pm$ 0.32	3.17 $\pm$ 0.68	2.92 $\pm$ 0.73	2.26 $\pm$ 0.27
Asiat Group	20	1.67 $\pm$ 0.25	2.32 $\pm$ 0.42*	2.01 $\pm$ 0.31*	1.16 $\pm$ 0.25*
<i>t</i>		1.762	4.756	5.131	13.37
<i>P</i>		0.086 1	<0.000 1	<0.000 1	<0.000 1

\* $P<0.05$ , 与CI组相比较。

\* $P<0.05$  compared with CI group.



A: 三组大鼠NO浓度比较; B: 三组大鼠MDA浓度比较; C: 三组大鼠SOD浓度比较。\* $P < 0.05$ , 与sham组相比较; # $P < 0.05$ , 与CI组相比较。

A: the comparison of NO concentration in three groups of rats; B: the comparison of MDA concentration in three groups of rats; C: the comparison of SOD concentration in three groups of rats. \* $P < 0.05$  compared with sham group; # $P < 0.05$  compared with CI group.

图1 Asiat对三组大鼠氧化应激影响的比较

Fig.1 Comparison of the effect of Asiat on oxidative stress of three groups of rats

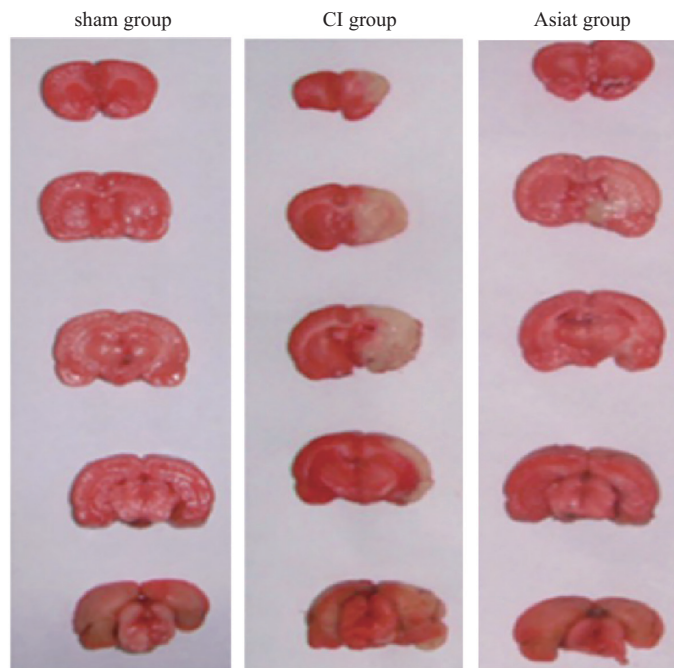


图2 三组大鼠脑组织TCC染色图片

Fig.2 Pictures of TCC staining in brain tissues of three groups of rats

表3 三组大鼠脑组织含水量比较

Table 3 Comparison of water contents in brain tissues of three groups of rats

组别	n	脑组织含水量/%
Group		Water content of brain tissue /%
sham group	10	77.82±1.32
CI group	10	85.91±1.82*
Asiat group	10	80.56±1.54**
F		87.94
P		<0.000 1

\* $P < 0.05$ , 与sham组相比较; # $P < 0.05$ , 与CI组相比较。

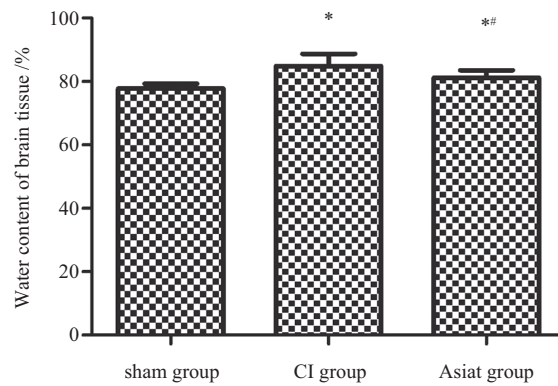
\* $P < 0.05$  compared with sham group; # $P < 0.05$  compared with CI group.

### 3.6 三组大鼠神经细胞凋亡及AI比较

与sham组大鼠相比, CI组大鼠神经细胞凋亡率明显升高( $P < 0.05$ ), 与CI组大鼠相比, Asiat组大鼠神经细胞凋亡率明显降低( $P < 0.05$ )(表5、图6和图7)。

### 3.7 Western blot检测比较大鼠Fos蛋白和Ki67蛋白的表达情况

和sham组相比较, CI组大鼠Fos蛋白明显增多, Ki67蛋白显著减少( $P < 0.05$ ); 经过Asiat干预后的



\* $P < 0.05$ , 与sham组相比较; # $P < 0.05$ , 与CI组相比较。

\* $P < 0.05$  compared with sham group; # $P < 0.05$  compared with CI group.

图3 三组大鼠脑组织含水量比较

Fig.3 Comparison of water contents in brain tissues of three groups of rats

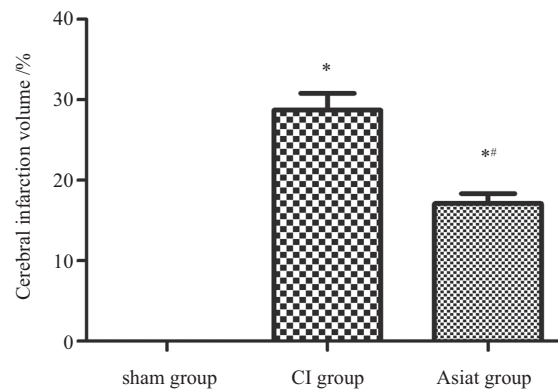
表4 三组大鼠脑梗死体积比较

Table 4 Comparison of cerebral infarction volumes among three groups of rats

组别 Group	<i>n</i>	脑梗死体积/% Cerebral infarction volume /%
sham group	10	0
CI group	10	28.31±2.22*
Asiat group	10	17.12±2.13*#
<i>F</i>		664.3
<i>P</i>		<0.000 1

\* $P < 0.05$ , 与sham组相比较; # $P < 0.05$ , 与CI组相比较。

\* $P < 0.05$  compared with sham group; # $P < 0.05$  compared with CI group.



\* $P < 0.05$ , 与sham组相比较; # $P < 0.05$ , 与CI组相比较。

\* $P < 0.05$  compared with sham group; # $P < 0.05$  compared with CI group.

图4 三组大鼠脑梗死体积比较

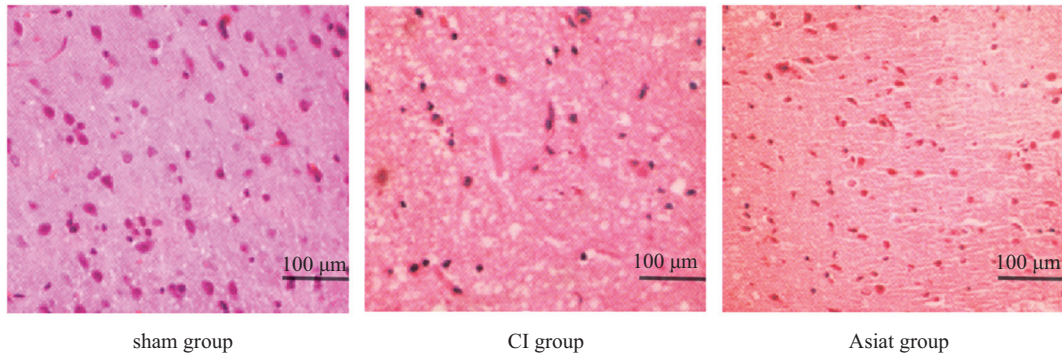
Fig.4 Comparison of cerebral infarct volumes in three groups of rats

Asiat组大鼠Fos蛋白表达比CI组大鼠显著降低, Ki67蛋白比CI组大鼠明显增多( $P < 0.05$ )(图8和图9)。

## 4 讨论

在脑血管疾病中, 脑梗死是最常见的疾病之一。当脑部的供血系统出现一定障碍时, 局部的脑

组织会出现缺血甚至坏死的现象, 造成神经功能的缺损, 从而形成脑梗死<sup>[11]</sup>。研究显示, 缺血会导致大脑组织葡萄糖和氧气的缺乏, 长时间缺血可导致的神经系统不可逆性的损伤, 最终导致患者残疾或死亡<sup>[12]</sup>。在制备脑梗死动物模型中, 最常用的就是线栓法, 这种模型的制备方法不仅价格低廉, 而且还能



sham组为正常大鼠脑组织, 脑区染色均匀, 组织结构清晰, 细胞质淡红, 细胞核轮廓清楚。CI组为脑梗死大鼠脑组织, 脑组织中可见灶状缺血区, 组织结构紊乱、间质缺水严重。Asiat组为干预后的脑梗死组织, 间质水肿减轻, 缺血面积减小, 坏死细胞减少, 细胞变性程度减轻。  
sham group was normal rat brain tissue; the brain area was uniformly stained; the tissue structure was clear; the cytoplasm was pale red; and the nucleus outline was clear. The CI group was the brain tissue of rats with cerebral infarction. Focal ischemic areas were seen in the brain tissue; the tissue structure was disordered; and the interstitial water shortage was severe. The Asiat group was the cerebral infarct tissue after intervention; the interstitial edema was reduced; the ischemic area was reduced; the necrotic cells were reduced; and the degree of cell degeneration was reduced.

图5 三组大鼠脑组织形态HE染色图

Fig.5 HE staining image of brain tissue morphology of three groups of rats

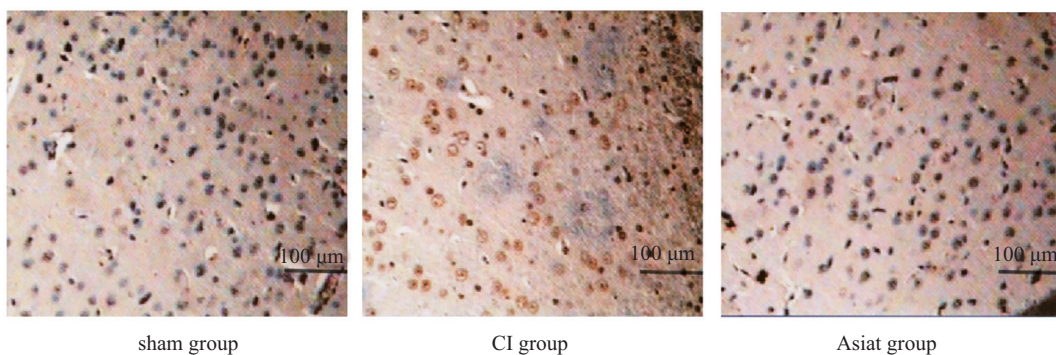
表5 三组大鼠神经元AI比较

Table 5 Comparison of AI in neurons of three groups

组别 Group	<i>n</i>	AI /%
sham group	10	3.41±1.12
CI group	10	41.82±6.22*
Asiat group	10	19.23±4.15*#
<i>F</i>		195.6
<i>P</i>		<0.000 1

\**P*<0.05, 与sham组相比较; #*P*<0.05, 与CI组相比较。

\**P*<0.05 compared with sham group; #*P*<0.05 compared with CI group.



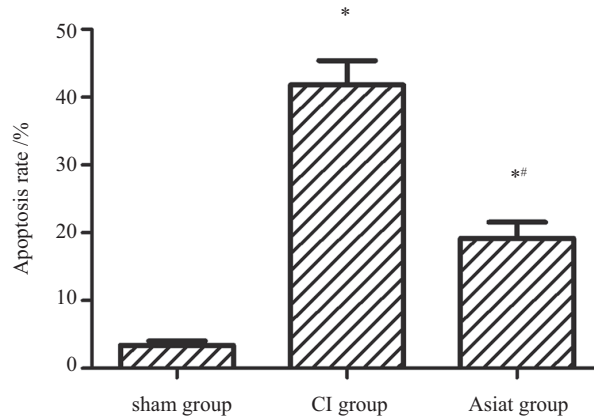
sham组大鼠脑组织没有细胞凋亡; CI组大鼠在缺血中心区周围有大量的细胞凋亡; Asiat组大鼠脑组织中细胞凋亡明显减少。  
There was no apoptosis in the brain tissue of the rats in the sham group; the rats in the CI group had a large number of apoptosis around the ischemic central area; the apoptosis in the brain tissue of the rats in the Asiat group was significantly reduced.

图6 三组大鼠TUNEL染色图

Fig.6 TUNEL staining image of three groups of rats

最真实地还原人类脑缺血的全部病理过程, 因此也被广泛应用到缺血性的脑血管疾病研究中<sup>[13]</sup>。在亚洲地区的神经疾病治疗的药物中, Asiat是最为常见的一

种, 目前也有研究证实, Asiat能有效地治疗心血管疾病和脑血管缺血性疾病, 并且能有效增强老年痴呆患者的认知能力<sup>[14]</sup>。学者研究证实, 细胞的凋亡、氧化



\* $P < 0.05$ , 与sham组相比较; # $P < 0.05$ , 与CI组相比较。

\* $P < 0.05$  compared with sham group; # $P < 0.05$  compared with CI group.

图7 三组大鼠细胞凋亡率比较

Fig.7 Comparison of apoptosis rates in three groups of rats

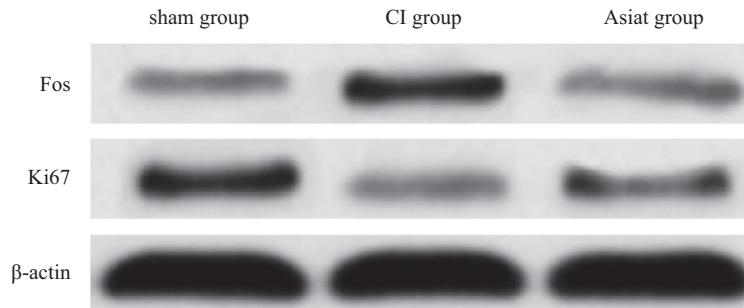
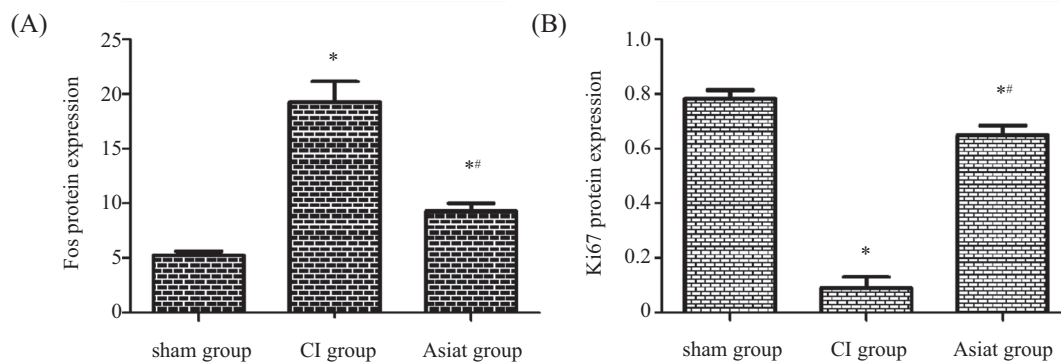


图8 三组大鼠Fos蛋白和Ki67蛋白表达

Fig.8 Fos protein and Ki67 protein expression in three groups of rats



A: 三组大鼠Fos蛋白表达比较; B: 三组大鼠Ki67蛋白表达比较。\* $P < 0.05$ , 与sham组相比较; # $P < 0.05$ , 与CI组相比较。

A: the comparison of Fos protein expression in the three groups of rats; B: the comparison of Ki67 protein expression in the three groups of rats.

\* $P < 0.05$  compared with sham group; # $P < 0.05$  compared with CI group.

图9 三组大鼠Fos蛋白和Ki67蛋白比较

Fig.9 Comparison of Fos protein and Ki67 protein in three groups of rats

应激反应和神经炎症等多个途径共同参与脑缺血的调控。本文制备脑梗死大鼠模型, 研究发现, Asiat能有效地减轻脑组织的损伤, 该结果也进一步证明了在神经系统中Asiat有一定的保护作用。

研究发现, 脑缺血发生时会产生大量的氧化产

物, 同时抗氧化系统也会失去活性, 从而让神经细胞膜发生脂质过氧化, 这时神经细胞会出现大量的死亡, 进而促进脑损伤发生<sup>[15]</sup>。机体保护系统主要利用酶类清除剂防御自由基脂质过氧化损伤: 例如SOD等。当机体清除活性氧的酶的活性降低时, 细



胞膜可受到氧自由基的攻击,从而导致脂质过氧化反应,从而形成脂质自由基及降解产物丙二醛(malondialdehyde, MDA), MDA在组织或体液中含量的增多,表明体内脂质过氧化反应增强,因而加重对组织细胞的损伤,所以检测MDA的含量可间接反应出细胞的损伤程度<sup>[16]</sup>。SOD是机体产生的一种活性酶,具有抗氧化作用,能有效清除体内过量的超氧阴离子,阻断一系列自由基反应,维持体内氧化和抗氧化动态平衡,保护细胞膜免受氧化和脂质过氧化的损伤<sup>[17]</sup>。本研究显示,和sham组大鼠相比,CI组大鼠的NO含量和MDA含量都显著增多( $P<0.05$ ),而SOD的浓度明显比sham组大鼠低( $P<0.05$ );和CI组相比较,Asiat组大鼠NO和MDA浓度明显降低,而SOD浓度较CI组显著升高( $P<0.05$ ),由此可见,Asiat可明显抑制脑梗死大鼠的氧化应激反应。

本文研究发现,CI组大鼠的脑组织积水明显增多,脑梗死体积也显著增加,并且脑组织神经元的细胞也出现了大量的凋亡;经过HE染色发现,CI组大鼠的脑组织形态紊乱,水肿和空泡现象严重,细胞质的染色明显不均匀,细胞核的染色较深,同时神经元的数量显著降低;干预治疗后的Asiat组大鼠脑组织积水量明显减少,脑梗死的体积也显著降低,并且细胞凋亡数量减少的同时脑组织的形态也明显改善了。可见,Asiat不仅能改变脑组织的积水量、脑梗死的面积及细胞凋亡的数量,还能有效地改善脑组织的病理性形态。LI等<sup>[18]</sup>研究发现,积雪草苷能有效地激活PI3K/Akt信号通路,从而使脑梗死大鼠的脑损伤得到有效缓解,并对血管的新生有一定的诱导作用。KRISHNAMURTHY<sup>[19]</sup>等研究显示,积雪草苷对急性脑缺血模型大鼠的脑组织有一定的保护作用。

细胞凋亡能有效地清除衰老及受到损伤的细胞。神经细胞的凋亡和坏死都是导致脑梗死患者神经功能缺损的主要因素,而氧化应激反应和炎症反应均是导致神经细胞凋亡的首要原因<sup>[20]</sup>。研究显示,Fos蛋白调控细胞凋亡,在脑缺血组织神经细胞中,Fos起着促进凋亡的作用。Ki67蛋白参与细胞增殖过程,反映细胞的增殖情况,随着对脑梗死研究的深入,Ki67也开始逐渐被应用于脑梗死的研究中。Ki67是内源性抗原,在细胞核中可直接进行蛋白检测,和外源性抗体相比较,内源性Ki67所在部位的表达相对稳定,并且Ki67只会在增殖的细胞中表

达,不会出现在修复期或即将衰亡的细胞中,是理想的细胞增殖标志物之一。本研究发现,和sham组相比较,CI组大鼠Fos蛋白明显增多,Ki67蛋白显著减少( $P<0.05$ );经过Asiat干预后的Asiat组大鼠的Fos蛋白相比于CI组大鼠显著减少,Ki67蛋白比CI组大鼠明显增多。这说明Asiat在脑梗死中发挥了作用,抑制了促凋亡因素,并促进了增殖细胞的生长。Asiat抑制了Fos蛋白的表达,降低了脑梗死的发生率,这也和一些文献报道的能减少脑缺血后脑损伤的治疗措施同时也减少了梗死区Fos蛋白的表达相一致。GANG等<sup>[21]</sup>研究显示,局灶性缺血后梗死区Fos蛋白的表达增加。YANG等<sup>[22]</sup>研究发现,脑缺血发生后早期,对照组大鼠和治疗组大鼠室管膜下区均出现了大量的Ki67阳性细胞,这可能与损伤后的缺血缺氧状态激活脑内源性神经新生有关。

综上,Asiat不仅能对脑梗死大鼠的氧化应激反应进行抑制,还能通过抑制Fos蛋白和促进Ki67蛋白的表达,从而起到保护脑组织的作用。

### 参考文献 (References)

- [1] YE H, WANG L, YANGX K, et al. Serum S100B levels may be associated with cerebral infarction: a meta-analysis [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 348(1/2): 81-8.
- [2] CHRYSANT S G, The age-related hemodynamic changes of blood pressure and their impact on the incidence of cardiovascular disease and stroke: new evidence [J]. *J Clin Hypertens (Greenwich)*, 2014, 16(2): 87-90.
- [3] YANG T Y, SUNIL S. Increased oxidative stress is responsible for severer cerebral infarction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2011, 17(6): 590-8.
- [4] LEE S, HASHIMOTO J, SUZUKI T, et al. The effects of exercise load during development on oxidative stress levels and antioxidant potential in adulthood [J]. *Free Radi Res*, 2017, 51(2): 1-15.
- [5] JIANN M H, RUI Y H, CHONG D J, et al. Relationship between serum paraoxonase-1 and oxidative stress in elderly patients with cerebral infarction and their roles in atherosclerosis [J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2015, 23(11): 882-4.
- [6] SCHWARZBOLD M L, RIAL D, DE BEM T, et al. Effects of traumatic brain injury of different severities on emotional, cognitive, and oxidative stress-related parameters in mice [J]. *J Neurotrauma*, 2017, 34(10): 1883-93.
- [7] MIZUTANI K, SONODA S, WAKITA H, et al. Functional recovery and alterations in the expression and localization of protein kinase C following voluntary exercise in rat with cerebral infarction [J]. *Neurol Sci*, 2014, 35(1): 53-9.
- [8] VASCELLARI M, GIANTIN M, NASSUATO C, et al. Expression of Ki67, BCL-2 and COX-2 in canine cutaneous mast cell tumours: correlations with grading and prognosis [J]. *Vet Pathol*, 2012, 146(1): 82.

- [9] NGUYEN H L, NGUYEN T D N. Production of asiaticoside from centella(*Centella asiatica* L.Urban)cells in bioreactor [J]. *Asian Pac J Trop Biomed*, 2013, 3(10): 806-10.
- [10] GOHIL K J, PATEL J A, GAJJAR A K. Pharmacological review on centella asiatica: a potential herbal cure-all [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72(5): 546-56.
- [11] CROWLEY R W, MEDEL R, DUMONT A S, et al. Angiographic vasospasm is strongly correlated with cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage [J]. *Stroke*, 2011, 42(4): 919-23.
- [12] WANG J W, QIU Y R, FU Y, et al. Transplantation with hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells suppresses brain injury caused by cardiac arrest-induced global cerebral ischemia in rats: hypoxic stem cells rescue global cerebral ischemia [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(10): 2059.
- [13] SCHMIDT A, WELLMANN J, SCHILLING M, et al. Meta-analysis of the efficacy of different training strategies in animal models of ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2014, 45(1): 239-47.
- [14] CHEN C L, TSAI W H, CHEN C J, et al. Centella asiatica extract protects against amyloid  $\beta$ 1-40-induced neurotoxicity in neuronal cells by activating the antioxidative defence system [J]. *J Tradi Complement Med*, 2016, 6(4): 362-9.
- [15] SHI R, WENG J, ZHAO L, et al. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia [J]. *Cns Neurosci Ther*, 2012, 18(3): 250-60.
- [16] HALL E D, WANG J A, MILLER D M. Relationship of nitric oxide synthase induction to peroxynitrite-mediated oxidative damage during the first week after experimental traumatic brain injury [J]. *Exp Neuro*, 2012, 238(2): 176-82.
- [17] ATAYA F S, FOUAD D, AL-OLAYAN E, et al. Molecular cloning, characterization and predicted structure of a putative copper-zinc SOD from the camel, *Camelus dromedarius* [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(12): 879-900.
- [18] LI L, GAO X Z, MA L P, et al. Asiaticoside attenuates brain tissue damage and induces angiogenesis in rats with focal cerebral infarction by activating PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2019, 35(17): 2068-71
- [19] KRISHNAMURTHY R G, SENUT M C, ZEMKE D, et al. Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from centella asiatica, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia [J]. *J Neurosci Res*, 2019, 97(11): 2541-50.
- [20] ZHANG H R, PENG J H, ZHU G Y, et al. Neuroprotective effects of Bcl-2 overexpression on nerve cells of rats with acute cerebral infarction [J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3): 7696-703.
- [21] SONG M K, KIM E J, KIM J K, et al. Effects of exercise timing and intensity on neuroplasticity in a rat model of cerebral infarction [J]. *Brain Res Bull*, 2020(6):160: 50-5.
- [22] YANG Z H, XU F X, PENG L B, et al. The proliferation of neurons around the infarct and subependymal area promotes the recovery of neural function in rats after BMSCs transplantation [J]. *Chinese Journal of Neuromedicine*, 2014, 13(4): 348-52.